

## モルモットNO2 暴露モデルにおける気道過敏性亢進 とヒスタミンN-メチルトランスフェラーゼ活性低下

著者	星 宏紀
号	3166
発行年	1999
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21906">http://hdl.handle.net/10097/21906</a>

氏 名（本籍）                      ほし                      ひろ                      き  
星                      宏                      紀

学 位 の 種 類                      博                      士                      （ 医                      学 ）

学 位 記 番 号                      医                      第                      3 1 6 6                      号

学位授与年月日                      平 成 11 年                      3 月                      3 日

学位授与の条件                      学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴                      平 成 元 年                      3 月  
岩手医科大学医学部卒業

学 位 論 文 題 目                      Nitrogen Dioxide Exposure Increases Airway  
Contractile Response To Histamine By Decreasing Histamine N-Methyltransferase Activity In Guinea Pigs.

（モルモット NO<sub>2</sub> 暴露モデルにおける気道過敏性亢進とヒスタミンN-メチルトランスフェラーゼ活性低下）

（主 査）

論 文 審 査 委 員                      教授 白 土 邦 男                      教授 田 上 八 朗

教授 貫 和 敏 博

# 論文内容要旨

## 【研究目的】

気管支喘息は慢性気道炎症と考えられ、活性化された好酸球や肥満細胞が重要な役割を演じていることが知られている。これまで我々は、気管支喘息患者の気道への好酸球浸潤の病態を解明するため、気管支生検組織、肺胞洗浄液さらに喀痰を用いて、接着分子（VCAM-1/VLA-4）の発現やサイトカイン（GM-CSF, IL-8, IL-5）の産生とその局在を、*In Situ* hybridization 法や免疫組織化学的手法を用いて検討し報告してきた。近年炎症細胞のみならず気道上皮細胞においても各種炎症性サイトカインの局在が数多く報告され、エフェクター細胞として注目されるようになった。我々も喀痰中の脱落気道上皮細胞に IL-8 の強い局在を確認している。気道上皮細胞は外界と直接接することで、大気汚染有害物質、タバコ、自動車排気ガス等あらゆる非特異的刺激を受けており、損傷と修復を繰り返していると推察される。NO<sub>2</sub> は重要な大気汚染物質の一つで近年増加傾向を認め、最近の喘息患者の増加との因果関係が検討されてきているが一定の見解を見ない。これまで我々は気道内のヒスタミン代謝分解が主に Histamine N-methyltransferase (HMT) によってなされ、その局在が気道上皮にあり、その活性と気道過敏性が相関することを報告してきた。そこで私は NO<sub>2</sub> をモルモットに経時的に暴露することで、気道組織内の HMT 活性の変化、ヒスタミンに対する気道過敏性の変化、そして気道上皮形態の経時的变化を調べ、大気汚染と気管支喘息発症との関係について検討した。

## 【研究結果】

### 1. NO<sub>2</sub> (2ppm) 暴露後のモルモット肺組織内のヒスタミン分解酵素 (HMT) 活性の変化

気管の HMT 活性は暴露前 ( $70.3 \pm 7.7$  pmol/min/mg protein) から暴露 12hr にかけて著明に低下 ( $39.8 \pm 8.8$  pmol/min/mg protein) したが、暴露 24, 48hr 後では前値まで回復し、96hr では ( $85.5 \pm 5.1$  pmol/min/mg protein) と逆に活性が前値に比べ上昇した。さらに主気管支、気管支、細気管支レベルで同様に HMT 活性を検討したが、末梢ほど遅れて (暴露 24hr から 48hr 後) HMT 活性の低下があり、96hr では気管と同様に HMT 活性が前値に比べ上昇した。

### 2. NO<sub>2</sub> (2ppm) 暴露後のヒスタミンに対する気道過敏性の変化

気管での HMT 活性が最低値となる暴露 12hr 後では、摘出気管でのヒスタミンに対する濃度反応曲線は暴露前に対して左に移動し、EC<sub>50</sub> が  $-5.16 \pm 0.09$  から  $-6.15 \pm 0.14$  ( $P < 0.01$ ) と有意に低下した。一方、HMT 活性が上昇する 96hr では、EC<sub>50</sub> が  $-5.20 \pm 0.10$  から  $-4.90 \pm 0.11$  ( $P < 0.05$ ) と有意に上昇した。暴露 12hr 後に摘出した気管のアセチルコリンに対する EC<sub>50</sub> も同

様に検討したが変化を認めなかった。

### 3. NO<sub>2</sub> (2ppm) 暴露後のモルモット気管内のヒスタミン含量の変化

肺組織中の HMT 活性は、NO<sub>2</sub> 暴露後に一時的に低下したが、ヒスタミン含量により HMT 活性が影響を受けないことを確認した。

### 4. NO<sub>2</sub> (2ppm) 暴露後のモルモット気管の組織学的検討 (hematoxylin-eosin 染色)

暴露 12hr 後に気道上皮細胞は、膨化、細胞質の空胞変性を認めたが、上皮の脱落はなかった。暴露 24hr 後では、気道上皮細胞は光顕上、形態的に正常に見え、暴露 96hr 後では単位面積当たりの気道上皮細胞の増加 ( $259 \pm 41/1\text{mm}$  of basement membrane から  $330 \pm 16/1\text{mm}$  of basement membrane) を認めた。粘膜下に浸潤した好酸球数は暴露 2hr 後に最も多く、その後の暴露では粘膜下に浸潤する好酸球は経時的に減少し、一方上皮内に浸潤した好酸球数は暴露 12hr 後に最も多く、その後も多数の好酸球浸潤の持続を認めた。

### 5. NO<sub>2</sub> (2ppm) 暴露後の気管組織における HMT mRNA の発現とその局在

NO<sub>2</sub> (2ppm) 暴露後のモルモット気管組織内の HMT mRNA の発現とその局在を調べるため、<sup>32</sup>S でラベルしたモルモット HMT cDNA プローブを用いて *In Situ* hybridization 法を行った。コントロール、暴露 12hr 後とも HMT mRNA のシグナルをほとんど認められなかったが、気道上皮細胞が修復され、増加した暴露 96hr 後では気道上皮の基底側に強い HMT mRNA の発現を認めた。一方コントロールプローブではいずれの標本でも陽性シグナルを認めなかった。

## 【研究の意義・独創的な点】

本研究で、2ppm の比較的低濃度の NO<sub>2</sub> 持続的暴露が気道粘膜障害を起こし、気道上皮に存在するヒスタミン分解酵素 (HMT) 活性低下をもたらして、気道過敏性を亢進させることを示した。NO<sub>2</sub> 暴露による気道過敏性亢進の機序を検討した報告はこれまでなく、気道上皮細胞に伴って生じる気道内のヒスタミン代謝の不均衡が気道過敏性の亢進をもたらすことを明らかにした点で、本研究は独創的で有意義である。また NO<sub>2</sub> 暴露という単一の刺激により粘膜下から気道上皮内への著明な好酸球浸潤を認めた本モデルは、気道過敏性を有し、喘息モデルとして有用と考える。さらに暴露 96 時間後、気道上皮内に多数の好酸球浸潤が認められたにもかかわらず、HMT 活性上昇と、ヒスタミンに対する気道過敏性が低下した事象は、今後臨床的に HMT (recombinant 等) の吸入といった新しい治療法の可能性を示唆したものである。

## 審 査 結 果 の 要 旨

気管支喘息（以下、喘息）の病態が肥満細胞やリンパ球浸潤を伴う慢性の好酸球性気道炎症であることが明らかになっている。動物モデルを用いたこれまでの多くの基礎研究により、この好酸球性気道炎症の成因には、抗原特異的な IgE や CD4 陽性細胞が関与することが報告されており、原因抗原の吸入暴露が喘息の発症の重要な誘因と考えられている。一方、近年都市部での喘息有病率の増加が認められ、社会問題にもなっている。この有病率増加の原因として、これまでの報告では、原因となる抗原吸入暴露のみならず、タバコや自動車排気ガスなどの大気汚染物質による気道上皮障害が気道過敏性の亢進をもたらすことが報告されているが、この亢進の機序に関する報告はない。そこで本研究では、大気汚染物質による気道過敏性亢進の機序をさらに詳細に検討するため、気道内でのヒスタミン代謝の異常、とくにヒスタミンの代謝分解酵素であるヒスタミン N-メチルトランスフェラーゼ（HMT）活性変化によるヒスタミン代謝の不均衡に注目し、より人に近い喘息反応を示すモルモットを用いて、大気汚染物質の中でも重要な二酸化窒素（NO<sub>2</sub>）持続暴露による気道過敏性亢進の機序を詳細に検討し、報告している。

これまで本研究者らは気道上皮に局在する HMT がヒスタミンに対する気道収縮反応を制御していることを *in vitro* と *in vivo* で報告していることから、本研究では低濃度（2ppm）の NO<sub>2</sub> 持続暴露による気道の HMT 活性の変化とヒスタミンに対するモルモット摘出気管輪の収縮反応並びに組織学的変化を検討した。その結果、HMT 活性は 12 時間の NO<sub>2</sub> 持続暴露で最低値になり、24～48 時間持続暴露で元のレベルまで回復し、96 時間暴露では逆にその活性が上昇すること、さらにその HMT 活性変化に一致してヒスタミンに対する気管輪の収縮反応が亢進（12 時間暴露）、回復（24～48 時間暴露）、低下傾向（96 時間暴露）を示すことを明らかにした。また、NO<sub>2</sub> 暴露による気道上皮障害と HMT 活性の低下、気道上皮損傷回復と HMT 活性の回復並びに HMT mRNA の発現増強が各々相関することを *in situ* hybridization 法などの手法を用いて示した。

以上のように、重要な大気汚染物質の 1 つである NO<sub>2</sub> が気道内へ持続的に暴露されると、気道上皮が損傷され、気道内 HMT 活性が低下し、気道内ヒスタミン代謝分解の不均衡がもたれること、その結果ヒスタミンに対する気道収縮反応の亢進がもたれることが、本研究により、初めて明らかにされた。その点で、本研究は画期的なものであり、喘息の発症予防や治療の観点からも意義があると考えられる。したがって、本研究は学位論文に値する。